

世界知的所有権機関
国際事務局



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, C12N 15/12, 15/10, G01N 33/50</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/03680</p> <p>(43) 国際公開日 1998年1月29日(29.01.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02485</p> <p>(22) 国際出願日 1997年7月17日(17.07.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/190933 1996年7月19日(19.07.96) JP 特願平9/77979 1997年3月28日(28.03.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 理化学研究所(THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH)[JP/JP] 〒351-01 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 間 陽子(AIDA, Yoko)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市高野台3丁目1番地の1 理化学研究所 ライフサイエンス筑波研究センター内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒103 東京都中央区八重洲一丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: METHODS FOR JUDGING THE POSSIBILITY OF THE ONSET OF BOVINE LEUKEMIA AND THE RESISTANCE THERETO</p> <p>(54) 発明の名称 ウシ白血病の発症可能性及び抵抗性の判定方法</p> <p>(57) Abstract A method for judging the possibility of the onset of bovine leukemia caused by bovine leukemia virus (BLV) wherein an individual carrying the amino acid sequence Val-Asp-Thr-Tyr as the one specified by the amino acid numbers 75 to 78 in the β1 domain of the bovine MHC Class II DRβ chain is judged to have a fear of the onset of this disease; and a method for judging the resistance to the onset of bovine leukemia caused by BLV wherein an individual carrying the amino acid Val as the one specified by the amino acid number 78 in the β1 domain of the bovine MHC Class II DRβ chain is judged to be resistant thereto.</p>		

(57) 要約

ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の可能性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78で特定されるアミノ酸配列がVal-Asp-Thr-Tyr であるウシ個体を白血病の発症可能性ありと判定する方法；並びに、ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であるウシ個体を白血病の発症抵抗性ありと判定する方法。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ギニア	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	ML	マリ	TR	トルコ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MW	モザンビーク	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	KR	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CN	中国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	LC	セントルシア	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		
DK	デンマーク						
EE	エストニア						

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

明 細 書

ウシ白血病の発症可能性及び抵抗性の判定方法

技術分野

本発明は、ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病の発症可能性及び白血病発症の抵抗性を評価する方法に関する。

背景技術

主要組織適合抗原(MHC) は、生体の感染防御機構において自己-非自己の識別に関与する分子であり、 α 鎖及び β 2MからなるクラスIと α 鎖及び β 鎖からなるクラスIIとからなり、それぞれの α 1と α 2ドメイン及び α 1と β 1ドメインには抗原ペプチドを噛み込む溝が存在している。そして、この溝に収容された断片化ペプチドのみがT細胞レセプターによって認識されるという特徴を有しており、クラスIを認識したCD8+細胞によって細胞死(細胞性免疫)が達成され、クラスIIを認識したCD4+細胞によって主として抗体産生(液性免疫)が誘導される。

MHC は最も多型に富んだ遺伝子群であり、そのハプロタイプによってペプチド収容溝のポケットの位置、形、大きさ、及び性状が異なり、それに伴って噛み込まれる断片化ペプチドの結合状態が変化し、個体ごとの免疫応答及び疾患感受性を決定しているものと考えられている。MHC ハプロタイプと疾患抵抗性(抗病性)又は発症可能性(易病性)との相関については、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV)、及びマラリヤに関する報告がある。

一方、ウシMHC(BoLA) クラスII遺伝子については、これまでに DQA, DQB, DRA, DRB, DNA, DOB, DYA, 及びDYB 遺伝子の存在が推測されている。なかでも、DRB 遺伝子座において同定されている3つの遺伝子(DRB1 ~B3)のうち、DRB3については機能的な蛋白質をコードすることが知られており、現在までに73種類の対立遺伝子の存在が明らかにされている。しかしながら、ウシの感染性疾患とウシMHC(BoLA) ハプロタイプとの相関については従来ほとんど報告がない。

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

特に、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)と同様にウイルス増殖を調節する遺伝子PXを有しており、HTLV-Iに最も近縁のレトロウイルスであるウシ白血病ウイルス(BLV)については、ウシMHC(BoLA) ハプロタイプとの相関に関して米国のグループが抗病性を中心に報告しているが、白血病発症可能性との関連性の報告は全くない。このウイルスに感染したウシの割合(日本における感染率)は10~20%であり、そのうちの1~2%は10~15年程度という長期の潜伏期間の後に極めて悪性の地方病性ウシ白血病を発症して死に至るので、このウイルスが引き起こす畜産農家への経済的損失は非常に深刻である。ウシMHC(BoLA) ハプロタイプの解析によってBLV感染後のウシの発症可能性を簡単に判定できるようになれば、発症抵抗性のウシを予め選択して飼育することが可能になり、極めて安全にウシの飼育を継続することが可能になるものと期待される。

従って、本発明の課題は、ウシ白血病ウイルス(BLV)とウシMHC(BoLA) ハプロタイプとの相関を解明し、ウシ個体のウシ白血病ウイルス(BLV)に対する白血病発症の可能性及び白血病に対する発症抵抗性を遺伝子工学的な手法で簡便に判定する方法を提供することにある。また、本発明の別の課題は、上記の判定方法に有用なプライマー・セットを提供することにある。

発明の開示

本発明者は、先に、ウシMHC(BoLA) クラスII遺伝子のうち、DRB 遺伝子座の構造を解析して、DRB3遺伝子(BoLA-DRB3) 及びその遺伝子産物の構造を明らかにした(Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, pp. 981-988, 1995)。本発明者はさらにこの遺伝子の機能を研究するうち、白血病発症牛と未発症牛とでは、BoLA-DRB3の中で特に多型が認められる第二エクソン(β 1ドメイン)からの遺伝子産物において、明らかにアミノ酸配列の異なる部分が存在することを見いだした。また、このアミノ酸置換が、BLV に対する発症可能性及び発症抵抗性に直接関与していることを見いだした。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の可能性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのア

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

ミノ酸番号75から78で特定されるアミノ酸配列がVal-Asp-Thr-Tyr であるウシ個体を白血病の発症可能性ありと判定する方法を提供するものである。この発明の好ましい態様によれば、ウシ白血病ウイルスBLV に感染したウシに対して行う上記方法；並びに、両方の対立遺伝子ともウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78で特定されるアミノ酸配列がVal-Asp-Thr-Tyr であるウシ個体を発症危険性ありと判定する上記方法が提供される。

また、本発明の別の態様によれば、ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の可能性を判定する方法であって、下記の工程：

(1) ウシ個体から分離したゲノムDNA をポリメラーゼ連鎖反応(PCR) により増幅してウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインの一部又は全部をコードするDNA を含むPCR 産物を調製する工程；及び

(2) 上記PCR 産物に含まれるDNA によりコードされるアミノ酸配列において、ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78に相当するアミノ酸配列がVal-Asp-Thr-Tyr であるウシ個体を白血病の発症可能性ありと判定する工程；を含む方法が提供される。この方法の好ましい態様では、PCR 産物をPstIで消化する工程を含んでいる。

本発明の別の観点によれば、ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であるウシ個体を白血病の発症抵抗性ありと判定する方法を提供するものである。この発明の好ましい態様によれば、ウシ白血病ウイルスBLV に感染したウシに対して行う上記方法；少なくとも一方の対立遺伝子においてウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であるウシ個体を発症抵抗性ありと判定する上記方法；並びに、両方の対立遺伝子ともウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であるウシ個体を発症抵抗性が高いと判定する上記方法が提供される。

また、本発明の別の態様によれば、ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、下記の工程：

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

(1) ウシ個体から分離したゲノムDNA をポリメラーゼ連鎖反応(PCR) により増幅してウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインの一部又は全部をコードするDNA を含むPCR 産物を調製する工程：及び

(2) 上記PCR 産物に含まれるDNA によりコードされるアミノ酸配列において、ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号78に相当するアミノ酸がValであるウシ個体を白血病の発症抵抗性ありと判定する工程；

を含む方法が提供される。この方法の好ましい態様では、PCR 産物をPstIで消化する工程を含んでいる。

これらの発明の好ましい態様によれば、下記のプライマー・セットとそれらを用いる上記方法、好ましくはそれぞれウシ白血病ウイルスBLV に感染したウシに対して行う上記方法が提供される。さらに本発明により、ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の可能性を判定するために用いるプライマー・セットであって、下記のAプライマー及びBプライマーを含むプライマー・セット(1)ないし(3) が提供される。

プライマー・セット(1)

Aプライマー：5'-TGTAACACGACGGCCAGTCTCTCTCTGCAGCACATTTCT-3'及び

Bプライマー：5'-CAGGAACAGCTATGACCCGCGCTGCACAGTGAAACTC-3'

プライマー・セット(2)

Aプライマー：5'-GGAATTCCTCTCTCTGCAGCACATTTCT-3'

Bプライマー：5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAAACTC-3'

プライマー・セット(3)

Aプライマー：5'-GAGTGTCAATTTCTTCAACGGGAC-3'

5'-GGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGA-3'、及び

5'-GGAATTCCTCTCTCTGCAGCACATTTCT-3' からなる群から選ばれ

るプライマー

Bプライマー：5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAAACTC-3'

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

図面の簡単な説明

第1図はウシMHC ClassII DR β 鎖の構造を示す図である。図中、(A)はウシMHC ClassII DR β 鎖 mRNA の構造を示し、(B)はウシMHC ClassII DR β 鎖をコードするcDNAの全長及びその遺伝子産物のアミノ酸配列を示し、 β 1ドメインはアミノ酸番号1からアミノ酸番号94までのアミノ酸配列により特定される部分である。

第2図(A)～(C)はウシ白血病ウイルスBLV 感染未発症牛 ((A)リンパ球増多症牛7頭、(B)及び(C)抗体陽性健康未発症牛24頭) 由来のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸 (アミノ酸番号9～86で特定されるアミノ酸配列) を比較した結果を示す図である。左側の数字はウシ個体の識別番号であり、図中、アミノ酸は一文字表記で示した。

第3図(A)及び(B)は白血病発症牛 (24頭) 由来のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸 (アミノ酸番号9～86で特定されるアミノ酸配列) を比較した結果を示す図である。左側の数字はウシ個体の識別番号であり、図中、アミノ酸は一文字表記で示した。

発明の実施するための最良の形態

本発明の方法は、ウシ白血病ウイルスBLV に感染したウシ、又はウシ白血病ウイルスBLV に未感染のウシについて、その個体の白血病発症の可能性を判定する方法である。また、本発明の別な方法は、ウシ白血病ウイルスBLV に感染したウシ、又はウシ白血病ウイルスBLV に未感染のウシについて、その個体の白血病発症の抵抗性を判定する方法である。

本発明の好ましい態様では、ウシ個体からゲノムDNA を分離した後、PCR 法によってウシMHC ClassII のDR β 鎖の β 1ドメイン (DRB3遺伝子の第二エクソン) の一部又は全部をコードする遺伝子の特異的に増幅し、得られたPCR 産物のシーケンシングを行って β 1ドメインのアミノ酸番号75から78で特定されるアミノ酸配列を推定する。このアミノ酸配列 (アミノ酸番号75-78) がVal-Asp-Thr-Tyr (一文字表記では VDTY で表される) であるウシ個体がすでにウシ白血病ウイルスBLV に感染している場合、又はウシ白血病ウイルスBLV に感染した場合には、そのウシ個体

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

は白血病の発症可能性がある。ウシ個体がウシ白血病ウイルスBLV に感染しているか否かは、抗ウシ白血病ウイルスBLV 抗体を用いた試験により容易に確認することが可能である。

上記の判定をより正確に行うためには、対立遺伝子（ハプロタイプ）における上記アミノ酸配列を比較することが好ましい。両方の対立遺伝子のアミノ酸配列（アミノ酸番号75-78）がVal-Asp-Thr-Tyr である場合（すなわちVDTYホモ）には、そのウシ個体がすでにウシ白血病ウイルスBLV に感染している場合、又はウシ白血病ウイルスBLV に感染した場合には、その個体は白血病発症の危険性が高い。一方、対立遺伝子におけるアミノ酸配列がVal-Asp-Thr-Tyr(VDTY) と Val-Asp-Thr-Val (VDTV) とのヘテロ；Val-Asp-Thr-Tyr(VDTY) と Val-Asp-Arg-Val (VDRV) とのヘテロ；Val-Asp-Thr-Val (VDTV)ホモ；Val-Asp-Arg-Val (VDRV)ホモ：又は、Val-Asp-Arg-Val (VDRV)とVal-Asp-Thr-Val (VDTV)ヘテロである場合などは、そのウシ個体がすでにウシ白血病ウイルスBLV に感染しているか、ウシ白血病ウイルスBLV に感染した場合であっても、白血病を発症する可能性は非常に低い。

さらに、白血病の発症抵抗性の観点からは、 β 1ドメインのアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸を推定する。このアミノ酸（アミノ酸番号78）が Val（一文字標記では Vで表される）であるウシ個体がすでにウシ白血病ウイルスBLV に感染している場合、又はウシ白血病ウイルスBLV に感染した場合には、そのウシ個体は白血病の発症に対して抵抗性を有している。抵抗性の判定においても、対立遺伝子（ハプロタイプ）における上記アミノ酸を比較することが好ましいが、対立遺伝子の少なくとも一方において β 1ドメインのアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であれば、そのウシ個体は白血病の発症抵抗性を有しており、両方の対立遺伝子の上記アミノ酸がVal であれば、その個体は白血病の発症に対して高い抵抗性を有している。

ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸配列については、間ら (Aida, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, pp. 981-988, 1995)による報告がある。図1にウシMHC ClassII DR β 鎖の mRNA の構造(A) 及び cDNA の全長と遺伝子産物のアミノ酸配列(B) を示した。図中、 β 1ドメインはアミノ酸番号1

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

からアミノ酸番号94までのアミノ酸配列により特定される部分であり、このヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、アミノ酸番号75から78までのペプチド配列が "Val-Asp-Thr-Tyr(VDTY)"である場合について図示してある。

本発明の判定方法の対象となるウシは特に限定されず、ウシ白血病ウイルスBLVに感染する可能性があり、感染により白血病を発症する可能性があるものであれば、乳用種、乳肉兼用種、肉用種、役用種、及び役肉兼用種などのいかなるウシを対象としてもよい。具体的には、例えば、黒毛和種、日本短角などの和牛、ホルスタイン、ジャージー、ヘレフォード、アバディーンアンガス、フリーシャン等の品種を挙げることができるが、これらの品種に限定されることはない。

ウシ個体からゲノムDNAを調製するための試料としては、末梢血や臓器などを利用することができる。臓器としては、例えば、リンパ節などの組織片を用いることができる。上記の試料からゲノムDNAを調製する方法としては、当業者に利用可能なものであればいかなるものを利用してもよい。試料として末梢血白血球、又は末梢血リンパ球を用いる場合には、例えば、Hughesらの方法 (Hughes, S. H. et al., Cell, 15, pp.1397-1410, 1978)を用いることができる。臓器を用いる場合には、例えば、凍結した組織片をハサミで薄切した後、ドデシル硫酸ナトリウム、フェノールクロロホルム法 (Mcknight, G. S., Cell, 14, pp.403-413, 1978)により調製することができる。また、細胞からのゲノムDNAの簡便抽出法を用いてもよいが、その詳細は実施例に記載した。

調製したゲノムDNAをPCR法により増幅するにあたり使用するプライマーとしては、ウシMHC ClassIIのDR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78までの部分アミノ酸配列又は β 1ドメインの全長をコードする遺伝子を含むDNAを増幅できるものであれば、いかなるものを用いてもよい。

本発明の方法に特に好適に使用可能なプライマーのセットとして、サイクルシーケンシング及びダイナビーズDNA直接シーケンシング等の直接シーケンス法が可能な下記のプライマーセット(1) : Aプライマー : 5'-TGTAACGACGGCCAGTCTCTCTCTGCAGCACATTTTCCT-3' ; 及びBプライマー : 5'-CAGGAACAGCTATGACCCGCCGTGCACAGTGAACTC-3' を挙げることができる。また、制

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

限酵素サイトを付加したプライマーセットとして、プライマー・セット(2) Aプライマー：5'-GGAATTCCTCTCTCTGCAGCACATTCCT-3'；及びBプライマー：5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAACTC-3'、又はプライマー・セット(3) Aプライマー：5'-GAGTGTCAATTTCTTCAACGGGAC-3'、5'-GGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGA-3'、及び5'-GGAATTCCTCTCTCTCTGCAGCACATTCCT-3' からなる群から選ばれるプライマー；Bプライマー：5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAACTC-3'を利用することができる。特に、プライマー・セット(3)を用いて増幅したPCR アリルをPstIで消化した後、切断パターンの違いを判定することにより、そのウシ個体が白血病抵抗性であるか、または白血病発症の可能性があるかを簡便に判定できる。もっとも、本発明の方法に利用可能なプライマー及びプライマー・セットはこれらに限定されることはない。

PCR 法に用いるDNA 量は適宜選択可能であるが、例えば、末梢血白血球又は末梢血リンパ球を用いる場合には 0.1~0.5 μ g 程度である。また、上記のようにして増幅されたDNA (PCR産物)のシーケンス決定法としては、当業者に利用可能なものであればいかなるものを利用してもよいが、例えば、直接シーケンス法などを用いることが好ましい。その具体例は実施例に詳細に記載されている。なお、多くのウシはヘテロ接合体(heterozygote)であり、父親又は母親由来の対立遺伝子の塩基配列が異なると、直接シーケンス法ではどちらの対立遺伝子なのかを決定することができないことがある。このような場合、上記のプライマー・セット(2)を用いて増幅されたPCR 産物を制限酵素EcoRIおよびSal Iで消化後ベクターにサブクロニングして、片方の対立遺伝子のみの塩基配列を決定して比較することにより、もう一方の対立遺伝子の塩基配列を確実に決定することが可能になる。より正確に遺伝子情報を得るためには、PCR 産物から両方の対立遺伝子をサブクロニングしてそれぞれの塩基配列を決定することが好ましい。その具体的方法及び利用可能なプライマーは下記の実施例に詳細に記載されている。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

例 1 : 白血病の発症可能性の検討

試料としてウシ個体から末梢血を抗凝固剤入りの注射筒で採取し、4℃、3,000 rpm の条件下で20分間遠心して白血球層を得た後、分離した白血球層をリン酸緩衝生理食塩水(PBS) で洗浄し、遠心によりペレットを得て末梢血白血球の試料とした。また、上記と同様にして採取した末梢血から、宮坂らの方法 (Miyasaka, M. and Trnka, Z., Immunological Methods, Vol. 3, pp.403-423, 1985, Academic Press, NY) により末梢血リンパ球を得て、上記と同様のペレットを得ることにより末梢血リンパ球の試料を調製した。また、BLV 感染浮遊細胞液を 4℃、1,100 rpm の条件下で5分間遠心して培養液を除去し、細胞をPBS で洗浄した後に遠心してペレット状の試料を調製した。さらに、BLV 感染リンパ肉腫を発症したウシのリンパ節及び腫瘍組織から組織片を分離し、無固定のまま液体窒素により急速凍結して-80℃で保存したものを組織片の試料とした。

1.5 ml のマイクロ遠心チューブの中で上記の各試料細胞をPBS で2回洗浄し、沈殿した細胞を再度PBS にボルテックスミキサーを用いて懸濁した。1×10⁶ 個の細胞に対して 200 μl の 1×PCR 緩衝液 [10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5% Tween-20] と 1 μl のプロテナーゼK (20 mg/ml) を加えてボルテックスミキサーで再懸濁し、56℃で45~60分間インキュベーションした。さらに、95℃で10分間処理した後、5分間以上氷冷して、約 5~10 μl をPCR 法での増幅に用いた。

200 μM の各dNTP、0.2 ~0.4 μM のプライマー、2.5 ユニットのTaq ポリメラーゼ (Gene Amp Kit; Perkin-Elmer Cetus) を含む50 μl の 1×PCR 緩衝液 [10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001%(w/v)ゼラチン] にゲノムDNA を溶解し、94℃で1分; 61℃で1分; 及び72℃で1分の処理を1サイクルとして25サイクルの増幅を行い、さらに72℃で5分間処理を行った。プライマーとしては、ウシMHC ClassII DRβ鎖のβ1ドメイン (BoLA-DR βのβ1ドメイン: DRB3遺伝子の第二エクソン) をPCR 法により特異的に増幅できる以下のプライマーを用い、Bプライマーの5'末端には特異的なビオチン化を導入した。なお、このプライマーは、サイクル・シーケンシングに好適に使用できるものである。

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

A プライマー : 5'-TGTAACGACGGCCAGTCTCTCTCTGCAGCACATTTTCCT-3'

B プライマー : 5'-CAGGAAACAGCTATGACCCGCCGCTGCACAGTGAAACTC-3'

20 μ l の DYNABEADS M-280 Streptavidin (Dynal A.S., N-0212, Oslo, Norway) を 100 μ l の 2 \times 結合-洗浄用緩衝液 (B&W 緩衝液: 10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1.0 mM EDTA, 2M NaCl, 0.1% Tween-20) で洗浄し、ビーズを 80 μ l の 2 \times B&W 緩衝液中に再懸濁した。このビーズ懸濁液に上記の PCR 産物 (50 μ l) を加えて穏やかにピペティングした後、ホイローレーターでゆっくり回転しながら室温で 15 分間インキュベートした。固定化された PCR 産物を含むチューブを磁石 (Dynal MPC) 上に置き、上清をピペットで除去した後、100 μ l の 2 \times B&W 緩衝液を加えてビーズを洗浄した。磁石を用いて再度上清を除去した後、用時調製した 0.1 M NaOH 50 μ l に再懸濁した。

ビオチン化鎖が固定化されたビーズを磁石を用いてチューブ壁に集めて上清を除き、ビーズを 50 μ l の 0.1 M NaOH で 1 回、100 μ l の 1 \times B&W 緩衝液で 3 回、50 μ l の TE 緩衝液で 1 回洗浄した。全ての操作において、スムーズなストロークで再懸濁を行った。さらに 100 μ l の蒸留水で洗浄した後に上清を除去し、蒸留水を加えて容量を調整してシーケンシングに用いた。シーケンシングは BcaBEST ジデオキシ・シーケンシング・キット (タカラ・バイオメディカルズ製) を用いて、添付の説明書に記載された条件に従って行った。なお、シーケンスプライマーとして以下のプライマーを用いた。

Forward プライマー : 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

Reverse プライマー : 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

結果を図 2 及び図 3 に示す (図中、ウシ MHC Class II DR β 鎖の β 1 ドメインのアミノ酸番号 9 から 86 を示し、左側の数字はウシ個体の識別番号である)。ウシ白血病ウイルス BLV に感染しているものの白血病を発症していないウシ [リンパ球増多症牛 (前癌状態) 7 頭、及び未発症牛 (抗体陽性健康未発症牛) 24 頭; それぞれ図 2 の上段及び下段]、及び白血病発症牛 (24 頭; 図 3) 由来のウシ MHC Class II DR β 鎖の β 1 ドメインのアミノ酸を比較したところ、白血病発症牛では両方の対立遺伝子においてアミノ酸番号 75 から 78 の配列が Val-Asp-Thr-Tyr (VDTY) モチーフ

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

を有しているという極めて特徴的な結果が得られた。アミノ酸番号75から78番目に相当する部位は β 1ドメインの α ヘリックス上に相当しており、T細胞認識部位として機能している可能性がある。また、コンピューター解析の結果、このモチーフはウシ白血病ウイルスBLVの中でpol 蛋白質にのみ存在していることが明らかになった。

以上の結果を表1に示す。表中の遺伝子型VDTY/VDTYなどの表記は、両対立遺伝子のアミノ酸配列（ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78まで）を一文字表記で記載したものである。なお、BLV感染牛の感染状態は、レヴィーら（Levy, D., et al., Int. J. Cancer, 19, pp. 822-827, 1977）及び間ら（Aida, Y., et al., Cancer Res., 52, pp. 6463-6470, 1992）の基準に基づいて分類した。

表 1

BLV 感染状態（陽性割合）			
遺伝子型	白血病発症	リンパ球増多症	健康
VDTY/VDTY	19/24	5/7	4/24
VDTY/VDTV	2/24	2/7	2/24
VDTY/VDRV	2/24	0/7	14/24
VDRV/VDRV	0/24	0/7	1/24
VDTV/VDTV	1/24	0/7	0/24
VDTV/VDRV	0/24	0/7	3/24

例 2：白血病の発症抵抗性の検討

例 1 と同様にして、白血病発症牛（24頭）、白血病未発症牛（リンパ球増多症及び健康牛、計31頭）について、ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

番号78のアミノ酸の種類を調べた結果を以下の表2に示す。また、71番目及び74番目のアミノ酸の種類も同様に調べた（表中、アミノ酸は一文字表記で示した。Y: Tyr; V: Val; R: Arg; E: Glu; K: Lys; N: Asn）。この結果、78番目のアミノ酸がバリンとチロシンのヘテロ接合である個体と、78番目のアミノ酸がバリンのホモ接合である個体は白血病発症に対して抵抗性であり、特に、78番目のアミノ酸がバリンのホモ接合である個体は、白血病発症に対して高い抵抗性を有していることが明らかとなった。また、白血病未発症のウシの74番目のアミノ酸はいずれもGln又はAsnであり、71番目のアミノ酸残基はLys又はArgであったことから、71番目のアミノ酸がリジン又はアルギニンであり、74番目のアミノ酸がグルタミン酸又はアスパラギンであり、かつ、78番目のアミノ酸がバリンであるアレルを有する個体は、白血病発症に対して高い抵抗性を有していることが示唆された。

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

表 2

遺伝子型	BLV 感染状態	陽性割合
------	----------	------

Y ⁷⁸ /Y ⁷⁸	白血病発症牛	19/24
V ⁷⁸ /Y ⁷⁸	白血病発症牛	4/24
(R ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ /Y ⁷⁸ ;		3/24)
(K ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ /Y ⁷⁸ ;		1/24)
(K ⁷¹ -N ⁷⁴ -V ⁷⁸ /Y ⁷⁸ ;		0/24)
V ⁷⁸ /V ⁷⁸	白血病発症牛	1/24
(R ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ /R ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ ;		1/24)
(K ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ /K ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ ;		0/24)
(K ⁷¹ -N ⁷⁴ -V ⁷⁸ /K ⁷¹ -N ⁷⁴ -V ⁷⁸ ;		0/24)
Y ⁷⁸ /Y ⁷⁸	白血病未発症牛	9/31
V ⁷⁸ /Y ⁷⁸	白血病未発症牛	18/31
(R ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ /Y ⁷⁸ ;		11/31)
(K ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ /Y ⁷⁸ ;		4/31)
(K ⁷¹ -N ⁷⁴ -V ⁷⁸ /Y ⁷⁸ ;		3/31)
V ⁷⁸ /V ⁷⁸	白血病未発症牛	4/31
(R ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ /R ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ ;		3/31)
(K ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ /K ⁷¹ -E ⁷⁴ -V ⁷⁸ ;		1/31)
(K ⁷¹ -N ⁷⁴ -V ⁷⁸ /K ⁷¹ -N ⁷⁴ -V ⁷⁸ ;		0/31)

例 3 : 発症可能性と抵抗性の迅速な判定方法

上記のように、ウシMHC ClassII DRβ鎖のβ1ドメインのアミノ酸番号78のアミノ酸がValである遺伝子を有する個体はウシ白血病ウイルスによる白血病に対して抵抗性であり、一方、両方の対立遺伝子の78番目のアミノ酸がTyrである個体は白血病の発症可能性がある。そこで、78番目のアミノ酸がValである遺伝子には存在

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

しており、78番目のアリルがTyrであるアリルには存在しない制限酵素 PstI 切断部位を利用して、増幅したPCR アリルを PstI で消化した後、切断パターンの違いによりそのウシ個体が白血病抵抗性であるか、または白血病発症の可能性があるかを簡便に判定できる。

PCR プライマーとして以下のプライマーを用いた。

A プライマー

DRB40: 5'-GAGTGTCAATTTCTTCAACGGGAC-3'

DRB100: 5'-GGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGA-3'

ERB3: 5'-GGAATTCCTCTCTCTGCAGCACATTCCT-3'

B プライマー

SRB3: 5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAACTC-3'

PCR の条件は例1の条件に準じて行った。具体的には、プライマーの組み合わせにより、以下のサイクルを1サイクルとして35サイクルの増幅を行い、さらに72℃で10分間処理を行った。ゲノムDNAはPCR 100 μ l の系に対して 100 ng を用いた。

DRB40/SRB3: 94℃で1分、63℃で2分、72℃で2分

DRB100/SRB3: 94℃で1分、66℃で2分、72℃で2分

ERB3/SRB3: 94℃で1分、61℃で2分、72℃で2分

上記のPCR産物を2%アガロースゲル電気泳動で確認した後、制限酵素 PstI で切断した(12 μ l中、10 \times 制限酵素用バッファー 1.2 μ l, 増幅後 DNA 6-7 μ l, 制限酵素PstI 2 units, 及び H₂O)。制限酵素による反応終了後、各検体を3%アガロースゲル電気泳動に付して判定を行った。結果を表3に示す。

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

表 3

プライマー	PCR 産物 (bp)	PstIフラグメントの大きさ(bp)			
		Y のアリル	V のアリル	Y/Y	Y/V
DRB40/SRB3	247	199, 48	247	199, 48	247, 199, 48
DRB100/SRB3	187	139, 48	187	139, 48	139, 187, 48
ERB3/SRB3 *	292	226, 48	274	226, 48	226, 274, 48

* ERB3プライマーにPstI切断部位が存在するので、いずれの場合にも18bpのフラグメントを含んでいた。

産業上の利用可能性

本発明の判定方法によれば、ウシ個体のウシ白血病ウイルス(BLV) に対する白血病発症の可能性及び抵抗性を確実に予知することができるので、安全なウシの飼育が可能になり、畜産農家の経済的損失を防ぐことができる。

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

請 求 の 範 囲

1. ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の可能性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78で特定されるアミノ酸配列がVal-Asp-Thr-Tyr であるウシ個体を白血病の発症可能性ありと判定する方法。
2. 両方の対立遺伝子ともウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78で特定されるアミノ酸配列がVal-Asp-Thr-Tyr であるウシ個体を発症危険性ありと判定する請求の範囲第1項に記載の方法。
3. ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の可能性を判定する方法であって、下記の工程：
 - (1) ウシ個体から分離したゲノムDNA をポリメラーゼ連鎖反応(PCR) により増幅してウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインの一部又は全部をコードするDNA を含むPCR 産物を調製する工程：及び
 - (2) 上記PCR 産物に含まれるDNA によりコードされるアミノ酸配列において、ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78に相当するアミノ酸配列がVal-Asp-Thr-Tyr であるウシ個体を白血病の発症可能性ありと判定する工程：を含む方法。
4. PCR 産物をPstIで消化する工程を含む請求の範囲第3項に記載の方法。
5. ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であるウシ個体を白血病の発症抵抗性ありと判定する方法。
6. 少なくとも一方の対立遺伝子においてウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であるウシ個体を発症抵抗性ありと判定する請求の範囲第5項に記載の方法。
7. 両方の対立遺伝子ともウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であるウシ個体を発症抵抗性が高いと判定する請求の範囲第5項に記載の方法。

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

8. ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、下記の工程：

(1) ウシ個体から分離したゲノムDNA をポリメラーゼ連鎖反応(PCR) により増幅してウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインの一部又は全部をコードするDNA を含むPCR 産物を調製する工程：及び

(2) 上記PCR 産物に含まれるDNA によりコードされるアミノ酸配列において、ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号78に相当するアミノ酸がValであるウシ個体を白血病の発症抵抗性ありと判定する工程；を含む方法。

9. PCR 産物をPstIで消化する工程を含む請求の範囲第8項に記載の方法。

10. ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の可能性又は抵抗性を判定するために用いるプライマー・セットであって、

(a) Aプライマー：5'-TGTAACACGACGGCCAGTCTCTCTCTGCAGCACATTCCT-3'及び

(b) Bプライマー：5'-CAGGAAACAGCTATGACCCGCCGCTGCACAGTGAACTC-3'

を含むセット。

11. ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の可能性又は抵抗性を判定するために用いるプライマー・セットであって、

(a) Aプライマー：5'-GGAATTCCTCTCTCTGCAGCACATTCCT-3'

(b) Bプライマー：5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAACTC-3'

を含むセット。

12. ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の可能性又は抵抗性を判定するために用いるプライマー・セットであって、

(a) Aプライマー：5'-GAGTGTCAATTTCTTCAACGGGAC-3'

5'-GGAGAAGAGTTTCGTGCGCTTCGA-3' 及び

5'-GGAATTCCTCTCTCTGCAGCACATTCCT-3'

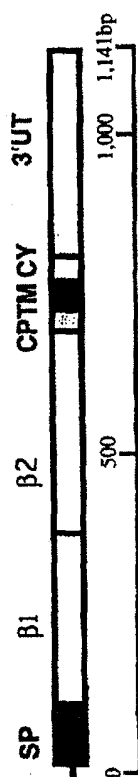
からなる群から選ばれるプライマー、並びに

(b) Bプライマー：5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAACTC-3'

を含むセット。

PCT/JP97/02485

第1圖



B

-29	5' UT	SP	MetValCysLeuTyrPheSerGlyGlySerTrpMetAlaLeuIleValMetLeuMetValLeuCysPro
0			<u>CTCTGCTGTCTCCGGCATGGTGGCTGTTATTTCTCGGAGCTCTCTGGATGGCAGCTCTGATAGTGGCTGTGTCCTGTGCCCC</u>
-5		β1	ProLeuAlaTrpAlaArgGluIleGlnProHisPheLeuGluTyrThrLysLysGluCysHisPhePheAsnGlyThrGluArgValArg
90			CCCTGTCCTCGGCCAGGAGATCCCAACCATTTCTCGGAGTATACCAAGAAAGATGTGATTTCTCAACGGGACCGGCGGTGGCG
26			PheLeuAspArgTyrPheHisAsnGlyGluGluPheValArgPheAspSerAspTrpGlyGluTyrArgAlaValThrGluLeuGlyArg
180			TTCTCGACAGATACTTCATATATGGAGAAGAGTTCTGTGCGCTTCGATAGCGACTCGGGCGAGTACCGGCGGTGACCCGAGCTAGGGCGG
56			ProAspAlaLysTyrTrpAsnSerGlnLysAspPheLeuGluGluLysArgAlaIleValAspThrTyrCysArgHisAsnTyrGlyVal
270			CCGGAGCCCAAGTACTGGAAACAGCCAGAGGAGCTTCTCGGAGGAGAAGCGGCGCGGTGTGCACATGTGCAGACACAACTACGGGGTC
		β2	
86			GlyGluSerPheThrValGlnArgArgValGluProIleValThrValTyrProAlaLysThrGlnProLeuGlnHisAsnLeuLeu
360			GGTGAGAGTTTCACTGTGCAGCGCGAGTGGAACTATAGTGACTGTGTATCTTGCATAAAGACCCAGCCCCCTGCAGCACACCACTCTCTG
116			ValCysSerValAsnGlyPheTyrProGlyAsnIleGluValArgTrpPheArgAsnGlyHisGluGluGluAlaGlyValIleSerThr
450			GTCTGCTCTGTGAACGGTTCTACCCAGGCAACATTGAAGTCAGGTGTTCCGGAATGGCCATGAAGAGAGGCTGTGGGTGATCTCCACA
146			GlyLeuIleGlnAsnGlyAspTrpThrPheGlnThrMetValMetLeuGluThrValProGlnSerGlyGluValTyrThrCysGlnVal
540			GGCCTGATCCAGAATGGAGACTGAGCACTTCCAGACCATGGTGATGCTTGAAACAGTTCTCAGAGTGGAGAGGTCTACACCTGCCAAGTG
		CP/TM/CY	
176			GluHisProSerGlnThrSerProIleThrValGluTrpArgAlaArgSerAspSerAlaGlnSerLysMetMetSerGlyValGlyGly
630			GAGCAACCCAGCCAGACAGCCCTATCAGATGAATGAGGGCAACGGTCTGACTCTGCTCAGACCAAGATGATGAGTGGAGTCTGGGGG
206			PheValLeuGlyLeuPhePheLeuAlaValGlyLeuPheIleTyrPheArgAsnGlnLysGlyArgProThrLeuGlnProThrGlyLeu
720			TTCTGTCTGGGTCTGTTCTTCTTCTGCGTGGGCTCTCTCATCTACTTCAGGAATCAGAAAGGACCGCCCTACACTTCAGCCCAACAGGGCTC
		3' UT	
236			LeuSerEnd
810			<u>CTGAGCTGAAGTGAAGAATGGTCAACACTCAAGGAAGAACCTTCTGTGCCAGCTTCTTCACAGATGGAAAGTTTCTCTGCTTAGTGCTTAAC</u>
900			TCTTCCAATGAAGTACTTTCTCAGATCTCATTTGTCTCTGCTCAGTACCCCTTAATAAAGTCTCCTCGATGGTTTCTTCAGTCAC
990			TCCACCTGTGCCCCTCAGCTTTTCACCTGGAGTCTCAATATGATTCAGTACCTATGTTCTTTCTCTCTGTTCCCTTCTTCTTT
1080			CAACTTCTGTTTCTGTGCACTGAGCTCATCTGTTTCACTTTTACTTTATTAATGTGTCTCTC

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

第2図 (A)

リンパ球増多症牛

	REIQPHLE ⁸⁶ Y TKKECHFFNG TERVRF ⁸⁶ LDY FHNGEEFVRF DSDWGEYRAV TELGRPD ⁸⁶ AKY WNSQKDFLEE KRAAVDTYCR HNYGVG ESFTVQRR
P1	-----N-----E-----EI--RA-----F-----SR-T-----F-----V-----
P2	-----S-----YT--N-----F-----EQ-----S-E-----Q-R-----V-----
P3	-----C-R-----SY--K-R-----F-----S-E-----Q-R-----V-----
P4	-----Q--H-G-----L--H-Y--Y--D-F-----S-E-----E-----EI--RA-----V-----
P5	-----STS-----Y-----D-----N-----RV-EQ L-G--T--RE--Y-----S-R-T-----I-----
P6	-----STS-----S-----L-----F--A-----E-----RV-EQ-----E-----EI--RA-----V-----
P7	-----C-R-----C-----N-----G-----Y-----Q-RV-E-C-----Q-EQ-----Y-----V-----
	-----S-S-----YT--T-----F-----D-F-----S-E-----R-R-E-----V-----
	-----S-S-----L--H-Y--Y--D-F-----S-E-----R-R-E-----V-----
	-----Q--H-G-----L--H-Y--Y--D-F-----S-E-----R-R-E-----V-----

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

第2図 (B)

抗体陽性健康未発症牛

	REIQPHFL ⁸⁶ LEY TKKECHFFNG	TERVRLD ⁸⁶ RY FHNGEEFVR ⁸⁶ F	DSDWGEYRAV	TELGRPD ⁸⁶ AKY	WNSQKDFLEE	KRAAVDTYCR	HNYGVG	ESFTVQRR
H1S-S.....E-S-Y.....Y.....E.....EI.....R-E-RV.....
H2S-S.....E-S-Y.....N.....E.....EI-R.....N-RV.....
H3N.....E.....EI-RA.....
H4S-S.....E-S-Y.....N.....E.....EY.....R-E-RV.....
H4S-S.....E-S-Y.....N.....E.....EI-R.....N-RV.....
H5C-R.....C.....F.....RV-EQ.....EI-RA.....I.....
H5N.....E.....EI-RA.....R-E-RV.....V.....
H6C-S.....E-S-Y.....N.....E.....EI.....R-E-RV.....
H6Q-H-G.....L-H-Y.....Y.....D-F.....S-E.....RR-E-V.....V.....
H7L-S.....E-S-Y.....N.....L-R.....N.....
H7C-R.....C.....F.....RV-EQ.....R-E-RV.....V.....
H8Q-H-G.....L-H-Y.....Y.....D-F.....A-EQ.....Q.....E-RV.....
H8Q-H-G.....L-H-Y.....Y.....D-F.....S-E.....RR-E-V.....
H9
H9S-S.....YT.....T.....F.....Q-E.....E-RV.....GM.....
H10S-S.....E-S-Y.....N.....E.....EI-R.....N-RV.....
H10N.....E.....EI-RA.....
H11S-S.....S-Y.....N.....E.....EI-R.....E-RV.....
H11E.....EI-R.....E-RV.....
H12S-S.....N.....E.....EI-RA.....
H12S-S.....YT.....N.....F.....EQ.....S-R-T.....F.....

PCT/JP97/02485

抗体陽性健康未発症牛

4/6

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

第3図 (A)

白血病発症牛 ⁹		86	
	REIQPHFLEY TKKECHFNG TERVRFLDRY FHNGEEFVR F DSDWGEYRAV TELGRPDACY WNSQKDFLEE KRAAVDTYCR HNYGVG ESFTVQRR		
L1	STS	STS	STS
L2	C-R	C-R	C-R
L3	S-S	S-S	S-S
L4	Q-H-G	Q-H-G	Q-H-G
L5	S-S	S-S	S-S
L6	S-S	S-S	S-S
L7	S-S	S-S	S-S
L8	STS	STS	STS
L9	Q-H-G	Q-H-G	Q-H-G
L10	H-S-R-H	H-S-R-H	H-S-R-H
L11	S-S	S-S	S-S
L12	STR	STR	STR

WO 98/03680

PCT/JP97/02485

第3図 (B)

白血病発症牛

L13	REIQPHFLEY TKKECHFENG TERVRELDY FHNGEFFVRF DSDWGEYRAV TELGRPDAY WNSQKDFLEE KRAAVDTYCR HNYGVG ESFTVQRR	86
L14	STS	SR-T
L15	STS	SR-T
L16	STS	SR-T
L17	STS	SR-T
L18	STS	SR-T
L19	STS	SR-T
L20	STS	SR-T
L21	STS	SR-T
L22	STS	SR-T
L23	STS	SR-T
L24	STS	SR-T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12Q1/68, C12N15/12, C12N15/10, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/00-15/90, C12Q1/68, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AIDA, Yoko et al. "Identification of a new bovine MHC class II DRB allele by nucleotide sequencing and an analysis of phylogenetic relationships", Biochemical and Biophysical Research Communications (1995) Vol. 209, No. 3, p. 981-988	1 - 12
P,A	STONE, D.M. et al. "Modulation of bovine leukemia virus-associated spontaneous lymphocyte proliferation by monoclonal antibodies to lymphocyte surface molecules", Clinical Immunology and Immunopathology (May 1997) Vol. 83, No. 2, p. 156-164	1 - 12
A	STONE, D.M. et al. "Up-regulation of IL-2 receptor alpha and MHC class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows", Veterinary Immunology and Immunopathology (1995) Vol. 48, Nos. 1, 2, p. 65-76	1 - 12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

October 14, 1997 (14. 10. 97)

Date of mailing of the international search report

October 28, 1997 (28. 10. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/02485 -

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12Q1/68, C12N15/12, C12N15/10, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/00-15/90, C12Q1/68, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	AIDA, Yoko et al. "Identification of a new bovine MHC class II DRB allele by nucleotide sequencing and an analysis of phylogenetic relationships", Biochemical and Biophysical Research Communications (1995) 第209巻, 第3号 p. 981-988	1-12
P, A	STONE, D. M. et al. "Modulation of bovine leukemia virus-associated spontaneous lymphocyte proliferation by monoclonal antibodies to lymphocyte surface molecules", Clinical Immunology and Immunopathology (5月, 1997) 第83巻, 第2号 p. 156-164	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 10. 97

国際調査報告の発送日

28.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/02485 -

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	STONE, D. M. et al. "Up-regulation of IL-2 receptor alpha and MHC class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows", Veterinary Immunology and Immunopathology (1995) 第48巻, 第1-2号 p. 65-76	1-12